

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LETÍCIA TREIN MEDEIROS

ESTUDO DA AÇÃO AGUDA DA PROGESTERONA SOBRE O EFEITO  
PSICOESTIMULANTE DA ANFETAMINA EM RATOS WISTAR  
MACHOS

CURITIBA

2020

LETÍCIA TREIN MEDEIROS

ESTUDO DA AÇÃO AGUDA DA PROGESTERONA SOBRE O EFEITO  
PSICOESTIMULANTE DA ANFETAMINA EM RATOS WISTAR  
MACHOS

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Farmacologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Roberto Andreatini

CURITIBA

2020

Universidade Federal do Paraná  
Sistema de Bibliotecas  
(Giana Mara Seniski Silva – CRB/9 1406)

Medeiros, Letícia Trein

Estudo da ação aguda da progesterona sobre o efeito psicoestimulante da anfetamina em ratos wistar machos. / Letícia Trein Medeiros. – Curitiba, 2020.

49 p.: il.

Orientador: Roberto Andreatini

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

1. Drogas 2. Anfetaminas 3. Dopamina 4. Progesterona I. Título II. Andreatini, Roberto, 1961- III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

CDD (22. ed.) 615.785




MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO FARMACOLOGIA -  
40001016038P0

### TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em FARMACOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de **LETÍCIA TREIN MEDEIROS**, intitulada: **ESTUDO DA AÇÃO AGUDA DA PROGESTERONA SOBRE O EFEITO PSICOESTIMULANTE DA ANFETAMINA EM RATOS WISTAR MACHOS**, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa. A outorga do título de Mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 28 de Fevereiro de 2020.

  
ALEXANDRA ACCO  
Presidente da Banca Examinadora

  
JULIANA GEREMIAS CHICHORRO  
Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

  
BRUNO JACSON MARTYNHAK  
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Paraná, por ter sido minha casa de ensino e descobertas nos últimos 7 anos. Trazendo muitas experiências e aprendizado para minha vida.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Roberto Andreatini, por ter me recebido em seu laboratório.

À minha colega de mestrado Manuela Machado, por todo apoio nos experimentos, ao João Kuroski que me auxiliou nos experimentos durante o estágio, e à todos outros colegas do Departamento de Farmacologia da UFPR.

À prof. Dr. Donita Robinson, por me receber em seu laboratório durante um curto estágio e ao Dr. Alexander Gomez por me acolher e ensinar as técnicas do laboratório em tão pouco tempo.

À CAPES pelo apoio financeiro.

Ao André Olivotto, meu melhor amigo, por sempre estar me apoiando, escutando lamentos, corrigindo meus textos, discutindo ideias, jogando *Bayonetta*, assistindo Rupaul, discutindo por causa de drag queen e sempre rindo de tudo no final. Obrigada por estar presente na minha vida nos últimos anos, passando por todo e qualquer momento juntos.

Aos meus amigos Haru, Felipe, Andrey, Natália, Raul, Cláudia e tantos outros, pela amizade de longa data, obrigada por resistirmos juntos.

Às minhas amigas Nilce, Maristela e Sônia, que me acompanharam durante a iniciação científica, por todos os dias no laboratório, aprendendo técnicas, processando amostras, discutindo ideias e nos divertindo.

À Tica e todos amigos da Mov'n'Art, por ser uma válvula de escape da realidade, através da dança e arte.

À Jéssica e ao André, sem vocês eu não teria sanidade durante o mestrado.

À minha família, meus pais Denise e Alex e meu irmão Gabriel, por todo o esforço, paciência e amor.

*“Como resgatar aquelas pessoas da própria mente?”*

Warren Ellis e Vários Artistas (2002)



## RESUMO

Os estimulantes tipo anfetamínicos são uma classe de drogas de abuso amplamente utilizada. Dentro dessa classe, a anfetamina (ANF) se destaca como um potente agente capaz de aumentar a liberação de monoaminas, especialmente a dopamina. Devido a essa ação sobre os neurônios dopaminérgicos, principalmente da via da recompensa, os derivados anfetamínicos possuem uma alta taxa aditiva. Contudo, a dependência em ANF é de difícil tratamento e existem poucas alternativas. Neste contexto, tem sido proposto a utilização da progesterona como um tratamento auxiliar, pois foi observado que os hormônios ovarianos são capazes de regular a liberação de monoaminas, principalmente a dopamina. Desta forma, estudos clínicos e pré-clínicos apontam que a progesterona (PRO) é capaz de reduzir a liberação dopaminérgica. Isto ocorre através da ação do metabólito alopregnanolona sobre os receptores GABAérgicos, facilitando a inibição de vias regulatórias, como no caso da via das recompensas. Em contrapartida, o estrogênio é capaz de facilitar a atividade dessa via, aumentando assim, a atividade dopaminérgica. Neste contexto, para evitar a ação do estrogênio na análise, foram utilizados ratos machos no experimento. Desta forma, foi avaliado o efeito de um pré-tratamento agudo com PRO (15 ou 30 mg/kg) sobre a ação da ANF (2.5 mg/kg). Os comportamentos avaliados foram as emissões de vocalizações ultrassônicas (USV) de 50-kHz (avaliação do total de USV, duração média e perfil de emissão das USV), locomoção, exploração e comportamento estereotipado. Ainda foi utilizado como controle positivo o haloperidol (0.2 mg/kg), um antagonista dopaminérgico para bloqueio da ação da ANF. Os resultados encontrados mostraram que a ANF foi capaz de aumentar os comportamentos avaliados (com excessão da exploração), enquanto o tratamento com PRO, em ambas as doses, não foi capaz de reduzir a ação do psicoestimulante em nenhum dos parâmetros avaliados. Já o tratamento com haloperidol resultou em uma redução de todos os parâmetros, mas, os animais apresentaram um possível estado de sedação. Os achados demonstraram que o pré-tratamento agudo com PRO é incapaz de bloquear os efeitos psicoestimulantes da ANF no comportamento de ratos machos.

**Palavras-chave:** Drogas de Abuso, Dopamina, Estereotipia, Locomoção, Vocalização Ultrassônica.

## ABSTRACT

Amphetamine-type stimulants are one of the most used drug class worldwide. Such drugs, as amphetamine (AMPH), are capable of increasing the release of monoamines, such as dopamine. These drugs act on synapses of dopaminergic neurons of reward pathway, leading to high addictivity ratios. However, there are few treatment alternatives for AMPH addiction. In this context, progesterone (PRO) has been suggested as an auxiliary treatment due to ovary hormones being able to control the release of monoamines. Preclinical studies show that this reduction occurs in dopaminergic release in special. This reduction occurs due to allopregnanolone acting upon GABAergic receptors, leading to regulatory pathways inhibition, such as rewarding. However, estrogen has the contrary effect and facilitates the dopaminergic release, increasing the activity of these pathways. To avoid this confounding factor of estrogen, this experiment used only male rats. A pretreatment was then assessed administering acute doses of progesterone (PRO) (15 or 30 mg/kg) on amphetamine (AMPH) treated rats (2.5 mg/kg). Measured behaviors were 50-kHz ultrasonic vocalizations (total vocalizations, mean duration and emission profile), locomotion, exploration and stereotyped behavior. Haloperidol (0.2 mg/kg) was used as positive control, which is a dopaminergic antagonist. Results show that AMPH was capable of increasing the behavioral parameters measured (except for exploration), while the PRO treatment was unable to reduce the psychostimulant effect on any parameter. Meanwhile, haloperidol reduced all the parameters, but the rats also showed sedation. These findings indicate that pre-treatment with acute PRO is ineffective to block the psychostimulant effect of AMPH on male rats behavior.

**Keywords:** Drug of Abuse, Dopamine, Stereotyped Behavior, Locomotion, Ultrasonic Vocalization.



## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - VOCALIZAÇÕES ULTRASSÔNICAS DE 50-KHZ .....	19
FIGURA 2 - PROGESTERONA E ALOPREGNANOLONA.....	21
FIGURA 3 - LINHA DO TEMPO EXPERIMENTAL .....	25
FIGURA 4 - PROTOCOLO EXPERIMENTAL DO DIA DO TESTE .....	26
FIGURA 5 - ILUSTRAÇÃO DA CAIXA DE ATIVIDADE .....	27

## LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 - TOTAL DE USV .....	30
GRÁFICO 2 - DURAÇÃO MÉDIA DE VOCALIZAÇÃO .....	31
GRÁFICO 3 - PERFIL DE EMISSÃO DOS SUBTIPOS DE USV .....	32
GRÁFICO 4 - ANÁLISE DA ATIVIDADE LOCOMOTORA .....	33
GRÁFICO 5 - ATIVIDADE EXPORATÓRIA (REARING) .....	34
GRÁFICO 6 - AVALIAÇÃO DE COMPORTAMENTO ESTEREOTIPADO.....	35

## **LISTA DE TABELAS**

TABELA 1 - DISTRIBUIÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	24
TABELA 2 - ESCALA DE ESTEREOTIPIA .....	28

## LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

ANF	- Anfetamina
ATV	- Área tegmentar Ventral
DA	- Dopamina
DAT	- Transportador de Dopamina
EPM	- Erro Padrão da Média
ETA	- Estimulantes Tipo Anfetamínicos
FM	- Frequência Modulada
GABA	- Ácido Gama-aminobutírico
HALO	- Haloperidol
i.p.	- Intraperitoneal
NA	- Noradrenalina
NAc	- Núcleo Accumbens
PRA	- Receptor de progesterona isoforma A
PRB	- Receptor de progesterona isoforma B
PRO	- Progesterona
s.c.	- Subcutâneo
SAL	- Salina
SNC	- Sistema Nervoso Central
USV	- Vocalizações Ultrassônicas
VEI	- Veículo
VMAT	- Transportador Vesicular de Monoaminas

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>16</b>
1.1 DROGAS DE ABUSO .....	16
1.2 VIA DAS RECOMPENSAS .....	16
1.3 ANFETAMINAS.....	17
1.4 VOCALIZAÇÕES ULTRASSÔNICAS .....	18
1.5 HORMÔNIOS E DROGAS DE ABUSO.....	20
<b>2 JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>22</b>
<b>3 OBJETIVOS.....</b>	<b>22</b>
3.1 OBJETIVO GERAL .....	22
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	22
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>23</b>
4.1 ANIMAIS.....	23
4.2 DROGAS.....	23
4.3 GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	24
4.4 DESENHO EXPERIMENTAL .....	24
4.5 TESTES COMPORTAMENTAIS.....	26
4.5.1 Vocalizações Ultrassônicas (USV) .....	26
4.5.2 Locomoção e Rearing .....	26
4.5.3 Comportamento estereotipado .....	27
4.6 EUTANÁSIA.....	28
4.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....	28
4.8 ASPECTOS ÉTICOS .....	29
<b>5 RESULTADOS.....</b>	<b>30</b>
5.1 AVALIAÇÃO DAS USV DE 50-KHZ .....	30
5.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE MOTORA .....	32
5.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE EXPLORATÓRIA .....	33
5.4 AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO ESTEREOTIPADO.....	34
<b>6 DISCUSSÃO .....</b>	<b>36</b>
<b>7 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>41</b>
7.1 RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS .....	41
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>42</b>
<b>8.APÊNDICE – CERTICADO CEUA .....</b>	<b>49</b>

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 DROGAS DE ABUSO

Atualmente, estima-se que cerca de 271 milhões de adultos no mundo (aproximadamente 5,5% da população) fizeram ou fazem uso de drogas de abuso ilícitas (UNODC, 2017). Segundo o Relatório Global produzido pela ONU em 2019, cerca de 29,5 milhões desses indivíduos sofrem do transtorno relacionado à substâncias, e apenas 1 a cada 6 pessoas com o transtorno é submetida a algum tratamento (UNODC, 2019). Os tratamentos atuais para o transtorno dependem do tipo de substância de abuso no qual o paciente é dependente. Mesmo sendo específicos, os tratamentos são complexos e nem sempre eficazes, tendo uma taxa de 40-60% de usuários com recaídas que voltam a consumir a substância (KREEK; LAFORGE; BUTELMAN, 2002). Contudo, apesar da diversidade de efeitos psicoativos entre as drogas de abuso, elas possuem um efeito em comum no cérebro que gera o estado de dependência: aumento na atividade da via dopaminérgica (REYNOLDS; BADA, 2003).

### 1.2 VIA DAS RECOMPENSAS

O mecanismo de ação comum entre as drogas de abuso é através da ação na via mesolímbica, especificamente na área tegmentar ventral (ATV) (KOOB; VOLKOW, 2010; REYNOLDS; BADA, 2003; VOLKOW *et al.*, 2004). A partir dessa região partem projeções para outras áreas cerebrais como amígdala, cortex pré-frontal medial, córtex cingulato anterior, globo pálido ventral e principalmente, núcleo accumbens (NAc) (REYNOLDS; BADA, 2003). Entre essas projeções, a via ATV-NAc, conhecida como via das recompensas, é fundamental para a geração da dependência. Conforme a exposição repetida de determinada droga, a interpretação de reforço é cada vez maior, o que leva a um ciclo de dependência (KOOB; VOLKOW, 2010; WISE; KOOB, 2014).



### 1.3 ANFETAMINAS

Dentro da classe dos psicoestimulantes, os estimulantes tipo anfetamínicos (ETA) são os mais utilizados como drogas de abuso, estimando quase 30 milhões de usuários em todo o mundo (UNODC, 2019). Nesta classe de estimulantes estão a anfetamina (conhecida popularmente como *rebite*), metanfetamina, MDMA, ecstasy e outros novos estimulantes sintéticos (HEAL *et al.*, 2013; UNODC, 2019). Ainda encontramos drogas da mesma classe sendo utilizadas na clínica para o tratamento do transtorno de déficit de atenção e hiperatividade e para a narcolepsia, como no caso do metilfenidato, dexanfetamina e lisdexanfetamina (HEAL *et al.*, 2013; YUN *et al.*, 2017). Dentro dos ETA, a anfetamina (ANF) e a metanfetamina possuem um perfil similar de ação e possuem maior potencial para abuso, sendo a metanfetamina mais potente que a ANF (LEE *et al.*, 2018).

A ANF é capaz de atuar nos terminais sinápticos de neurônios monoaminérgicos [dopamina (DA), noradrenalina (NA) e serotonina], elevando a concentração das mesmas na fenda sináptica (DI CHIARA; IMPERATO, 1988). Uma das vias dopaminérgicas mais relevantes que a ANF atua é a via da recompensa, o que caracteriza o potencial adictivo da droga (NUTT *et al.*, 2015). De forma específica, a ANF é capaz de atuar nos terminais sinápticos dos neurônios dopaminérgicos provindos da ATV na região do NAc. Uma vez na região sináptica, a ANF atua como substrato competitivo pelo transportador de dopamina (DAT), sendo transportada ativamente por ele para o interior celular. No citosol, a ANF é capaz de interagir com três alvos: (a) o transportador vesicular de monoaminas (VMAT), no qual ela é captada no lugar da DA e ocupa o interior das vesículas de armazenamento de DA, alterando o *pool* citosólico de DA; (b) a monoamina oxidase (MAO) é parcialmente bloqueada pela ANF, o que impede a degradação do excesso de DA citosólico; (c) a porção intracelular do DAT também é um alvo uma vez que, de forma indireta, a ANF induz uma mudança conformacional no transportador. O DAT então passa a fazer um efluxo de DA acumulada ao invés de influxo (MAUNA *et al.*, 2019). Dessa forma, o resultado é um aumento da liberação de DA na fenda (THOMPSON; LEONARD; BRUDZYNSKI, 2006). Essa reação é interpretada como uma recompensa, e pela exposição repetitiva leva à dependência da droga (HEAL *et al.*, 2013; WISE; KOOB, 2014).

Além da atividade na via das recompensas, o aumento de monoaminas causado pelas drogas psicoestimulantes, como a ANF, levam a outros efeitos ao organismo. Em humanos são observadas alterações como aumento da pressão sanguínea, taquicardia, agitação psicomotora, redução de apetite, euforia, aumento de impulsividade e mudanças afetivas (sensação de estar “high”, pensamento acelerado e outros) (HEAL *et al.*, 2013). Já em modelos animais, como em ratos, a presença da droga leva a um aumento da atividade cardiovascular, ocorrendo também um aumento da atividade motora, aumento da impulsividade e comportamento de risco. Os animais também podem apresentar comportamentos estereotipados e ocorre um aumento das vocalizações ultrassônicas de 50-kHz (PEREIRA *et al.*, 2014; RIPPBERGER *et al.*, 2015; SIMOLA *et al.*, 2012).

#### 1.4 VOCALIZAÇÕES ULTRASSÔNICAS

As vocalizações ultrassônicas (USV) são um comportamento natural de roedores. Elas são emitidas em uma frequência não audível para humanos e para vários predadores. Na fase adulta, elas são emitidas em duas faixas principais de frequência, de 22-kHz e de 50-kHz. Estudos apontam que as USV denominadas de 22-kHz (que ocorrem dentro da faixa de 18 a 33-kHz) estão relacionadas ao que denominamos “afeto negativo”, uma vez que estas são emitidas pelos animais em situações de desconforto, estresse, medo, dor ou na presença de algum predador (BARKER; SIMMONS; WEST, 2015; BRUDZYNSKI, 2015; KNUTSON, 2002). Já as USV de 50-kHz (que variam de 38 a 80-kHz) são denominadas de “afeto positivo”. Essas USV por sua vez são emitidas naturalmente em situações sociais, brincadeiras, cópula, alimentação e exploração (KNUTSON; BURGDORF; PANKSEPP, 1999; WÖHR; SCHWARTING, 2013) e também pode-se induzir o aumento das mesmas após a administração de drogas psicoestimulantes (ENGELHARDT *et al.*, 2017; RIPPBERGER *et al.*, 2015; WENDLER *et al.*, 2016).

As USV de 50-kHz são subdivididas em dois grupos, as do tipo *flat* e as frequências moduladas (FM). As USV *Flat-call* são visualizadas em espectrogramas como linhas retas que não possuem uma variação superior a 5-kHz na faixa frequência. Elas estão mais relacionadas à comunicação social e são mais comumente emitidas. Já as FM estão mais relacionadas afeto positivo, tendo menor

frequência de emissão. Elas por sua vez são divididas em três subtipos: a primeira é a *Trill*, uma vocalização semelhante a um zig-zag onde os picos superiores e inferiores se diferenciam por mais de 5-kHz. O segundo subtipo é chamado de *Step-call*, que é caracterizado por uma emissão reta com uma outra emissão emendada (antes ou depois) com uma diferença de pelo menos 5-kHz. Por fim, o último subtipo é chamado como *Mixed call* que é uma frequência modulada que não encaixa em nenhuma das outras categorias ou aparenta ser uma mistura entre elas (Figura 1) (BURKE *et al.*, 2017; ENGELHARDT *et al.*, 2017; PEREIRA *et al.*, 2014)

FIGURA 1 - VOCALIZAÇÕES ULTRASSÔNICAS DE 50-KHZ

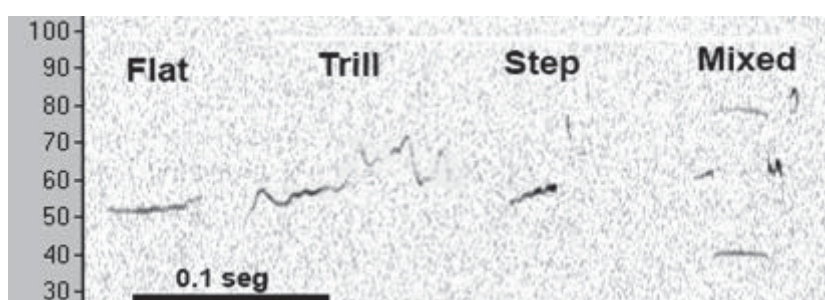


Imagem do espectrograma da gravação de USV mostrando os quatro subtipos analisados. A escala à esquerda mostra a frequência em kHz e a escala abaixo mostra o tamanho no espectro equivalente a 0,1 segundo. A primeira vocalização é do tipo *flat-call*, a segunda do tipo *trill*, a terceira *step-call* e a última uma *mixed*. Fonte: O autor (2020)

Observa-se uma relação entre a emissão das USV de 50-kHz com o aumento de liberação de DA no SNC. As regiões mesolímbicas como no Nac parecem estar envolvidas diretamente na emissão das USV. É possível induzir a emissão de USV com infusões de ANF nessas regiões (BRUDZYNSKI *et al.*, 2011) e também é possível bloquear as mesmas através de antagonistas dopaminérgicos (BUCK *et al.*, 2014; RINGEL *et al.*, 2013; THOMPSON; LEONARD; BRUDZYNSKI, 2006)

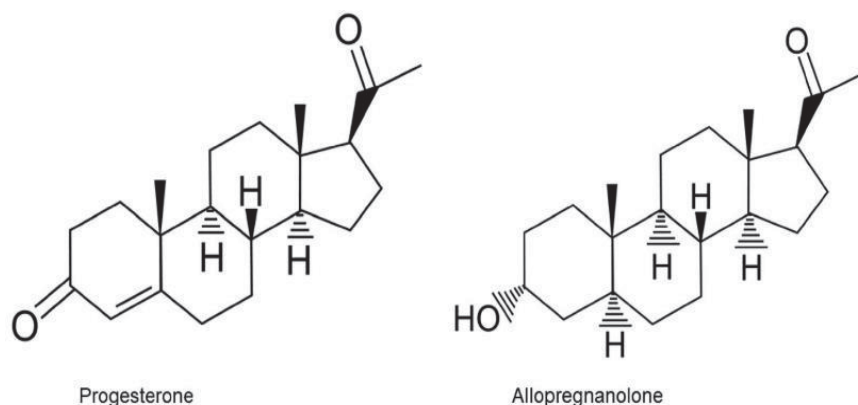
Estudos vêm utilizando as USV de 50-kHz e de 22-kHz, como um parâmetro para a avaliação de diversos aspectos do transtorno relacionado à substâncias. Estão sendo feitas avaliações do efeito agudo das drogas, no comportamento de busca pela droga, durante a auto-administração, nos sinais de abstinência e até de recaída (BARKER *et al.*, 2014; BUCK *et al.*, 2014; DE OLIVEIRA GUAITA *et al.*, 2018; MAHLER *et al.*, 2013; MAIER *et al.*, 2012; SIMOLA; MORELLI, 2015). Os psicoestimulantes, como a ANF, levam a um aumento das USV de 50-kHz

diretamente numa exposição aguda, ao elevar a liberação de DA no NAc (BRUDZYNSKI *et al.*, 2011; RIPPBERGER *et al.*, 2015). Dessa forma, a avaliação das USV é uma avaliação indireta e proporcional ao efeito da ANF no cérebro, sendo uma ferramenta válida e não invasiva de avaliação da atividade dopaminérgica.

## 1.5 HORMÔNIOS E DROGAS DE ABUSO

Inicialmente, o efeito da progesterona (PRO) era tido no cérebro como limitado a uma ação genômica nos receptores nucleares de progesterona do tipo A (PRA) e tipo B (PRB). Porém, atualmente, já se conhece seus efeitos não genômicos como neuroesteróides (BEAUCHAMP *et al.*, 2000; PELTIER; SOFUOGLU, 2018). Foi observado que metabólitos da PRO ampliavam o efeito anestésico do tiopental, indicando, então, um potencial inibitório desses metabólitos (LAMBERT *et al.*, 1987). Sabe-se que a PRO no cérebro é metabolizada em alopregnanolona (ALO) (Figura 2), um neuroesteróide que atua como um potente modulador alostérico positivo de receptores GABA-A (UUSI-OUKARI; KORPI, 2010), de forma a facilitar a inibição neuronal pelo influxo de íons cloreto dependente de estímulo GABA (BEAUCHAMP *et al.*, 2000). Mais uma evidência para essa teoria são as ligações do pico de PRO com picos de limiares de crises convulsivantes, sendo, por exemplo, um potencial tratamento para epilepsia (WU; BURNHAM, 2018).

FIGURA 2 - PROGESTERONA E ALOPREGNANOLONA



Estrutura química da progesterona (PRO) e da alopregnanolona (ALO). Fonte: Peltier e Sofuoglu (2018).

Além da epilepsia, estudos apontam a relação da flutuação hormonal feminina com o perfil de uso de drogas de abuso, como no caso dos estimulantes, seja em animais seja em humanos (ANKER; CARROLL, 2010; CARROLL; ANKER, 2010; PELTIER; SOFUOGLU, 2018; WHITE; JUSTICE; WIT, 2002) de forma que o pico de estrogênio está intimamente relacionado ao aumento das sensações positivas dos psicoestimulantes e durante o pico de PRO se observa uma redução dessas sensações (EVANS, 2007; QUINONES-JENAB; JENAB, 2010). Além disso, outros aspectos relacionados à dependência dessas drogas, como reforço, fissura e recaída também são influenciados pela presença desses hormônios sejam eles endógenos ou exógenos (LYNCH, 2017; MILIVOJEVIC *et al.*, 2016; PELTIER; SOFUOGLU, 2018). Contudo, os resultados ainda são controversos e não está claro se essa influência hormonal seria o suficiente para o tratamento do transtorno relacionado à substâncias (PELTIER; SOFUOGLU, 2018).

## 2 JUSTIFICATIVA

Estudos com a PRO e seus metabólicos apontam um potencial das mesmas como tratamento auxiliar para a dependência de algumas drogas. Os estudos clínicos e pré-clínicos já realizados com cocaína apontam resultados promissores. Contudo, os estudos com as ANF ainda são escassos e não está elucidado se a ação é semelhante à observada com cocaína. Desta forma, este trabalho focou em fazer uma análise do efeito da PRO sobre os efeitos da ANF de forma aguda, como um passo inicial para a análise do tratamento com PRO no abuso da ANF.

## 3 OBJETIVOS

### 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito do pré-tratamento agudo com PRO sobre o efeito psicoestimulante da ANF no comportamento de ratos machos.

### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito psicoestimulante da ANF através dos comportamentos de locomoção, emissão de USV de 50-kHz, *rearing* e estereotipia de ratos Wistar machos.
- Avaliar o efeito do tratamento agudo com PRO nas doses de 15 e 30 mg/kg em ratos tratados ou não com ANF nos comportamentos de locomoção, emissão de USV de 50-kHz, *rearing* e estereotipia.
- Avaliar o efeito do tratamento agudo com haloperidol em ratos psicoestimulados ou não com ANF nos comportamentos de locomoção, emissão de USV de 50-kHz, *rearing* e estereotipia.



## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 ANIMAIS

Os animais utilizados foram ratos Wistar machos pesando entre 250-350 g no dia do teste (aproximadamente 70 dias de vida), provenientes do biotério do setor de Ciências Biológicas da UFPR. Os grupos experimentais variaram de 9 a 16 animais, totalizando 95 animais machos para os testes comportamentais. Os ratos foram mantidos em caixas plásticas (60 X 25 X 25 cm), 4 animais por caixa, sob temperatura controlada ( $25 \pm 2$  °C), ciclo claro/escuro de 12:12 (luzes acesas às 7h e apagadas às 19h) e água e ração *ad libitum*.

### 4.2 DROGAS

- dl-Anfetamina (ANF) (Sigma, EUA) – 2,5 mg/kg, dissolvido em salina – Administrada em dose única 10 min antes do teste por via intraperitoneal (i.p.)
- Progesterona (PRO) (Sigma, EUA) - 15 ou 30 mg/kg, dissolvido em veículo oleoso - Administrada em dose única 30 min antes do teste via subcutânea (s.c.)
- Haloperidol (HALO) (Janssen, Bélgica) - 0,2 mg/kg, solução inerte (ácido láctico, água purificada e metilparabeno) – Administrada em dose única 30 min antes do teste por via intraperitoneal (i.p.)
- Hidrato de cloral (Sigma, EUA) - solução a 15% em salina, 1ml – Administrada em dose única 10 min antes da eutanásia como anestésico via intraperitoneal (i.p.)
- Salina 0,9% (SAL) como controle para anfetamina – 1ml/kg administrada em dose única 10 min antes do teste por via intraperitoneal (i.p.)
- Óleo de canola como veículo (VEI) para PRO – 1 ml/kg Administrada em dose única 30 min antes do teste via subcutânea (s.c.)

Justificativa das doses:

Foi escolhida a dose de ANF segundo Pereira et al (2014). Dose descrita como capaz de induzir um aumento dos parâmetros comportamentais analisados.

As doses de PRO foram estimadas através de calculos alométricos (REAGAN-SHAW; NIHAL; AHMAD, 2008) com base nos estudos de Wu *et al* (2018), que determinou uma dose neuro-ativa de PRO em camundongos através da avaliação do seu potencial anticonvulsivante. Também embasamos nossa dose no estudo de Reed *et al* (2010) que utilizou PRO em humanos para uma avaliação ação da mesma sobre os efeitos de ANF. As doses de 15 e de 30 mg/kg estão na faixa calculada.

Foi escolhida a dose de HALO segundo Oliveira de Guaita *et al* (2018). Droga escolhida como controle positivo para o bloqueio da psicoestimulação da ANF.

#### 4.3 GRUPOS EXPERIMENTAIS

A divisão dos grupos experimentais está representada na Tabela 1. O número total de grupos foi 8, sendo destes, 4 grupos Salina (SAL/VEI, SAL/PRO 15, SAL/PRO 30 e SAL/HALO) e 4 grupos Anfetamina (ANF/VEI, ANF/PRO 15, ANF/PRO 30 e ANF/HALO).

TABELA 1 - DISTRIBUIÇÃO DO NÚMERO DE ANIMAIS POR GRUPO EXPERIMENTAL

	<i>Salina</i>	<i>Anfetamina 2,5 mg/kg</i>
Veículo (óleo de canola)	11	12
Progesterona 15 mg/kg	13	16
Progesterona 30 mg/kg	11	13
Haloperidol 0,2 mg/kg	9	10

Número de animais utilizados distribuidos nos grupos experimentais. Fonte: O autor (2020)

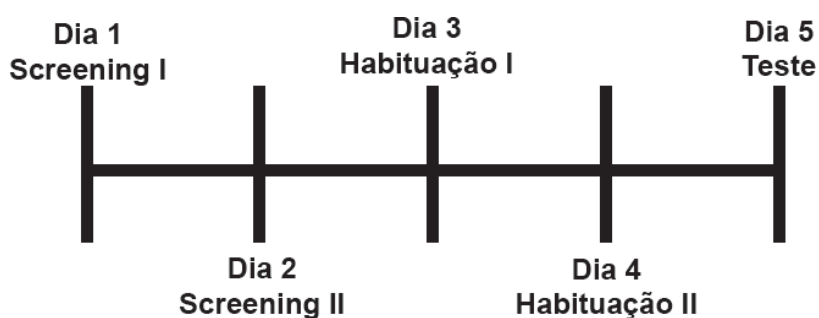
#### 4.4 DESENHO EXPERIMENTAL

Os animais foram retirados do biotério central do Setor de Ciências biológicas da UFPR e realocados na sala de manutenção do Laboratório de Fisiologia e Farmacologia do Sistema Nervoso Central do departamento de farmacologia. Eles permaneceram na sala de manutenção para habituação durante uma semana antes de serem iniciados os procedimentos experimentais. Após essa habituação os animais passaram por dois dias de *screening*. Nestas sessões são contabilizadas as USV espontâneas dos animais durante 5 min. Com os valores das

USV espontâneas, os animais foram divididos de forma randomizada e estratificada entre os grupos experimentais para evitar algum viés de uma divisão apenas randomizada nos grupos. Nos dois dias consecutivos os animais passaram por sessões de habituação onde o animal é primeiramente aclimatado durante uma hora na sala de experimentação. No primeiro dia, o animal foi apresentado à caixa de atividade sem nenhuma manipulação prévia e no segundo dia o animal recebeu uma injeção de SAL i.p. e uma s.c. 10 min antes de ser colocado na caixa de atividade para que ocorresse uma habituação à manipulação e injeção. Em ambos os dias os animais passaram por 20 min de habituação na caixa (Figura 3).

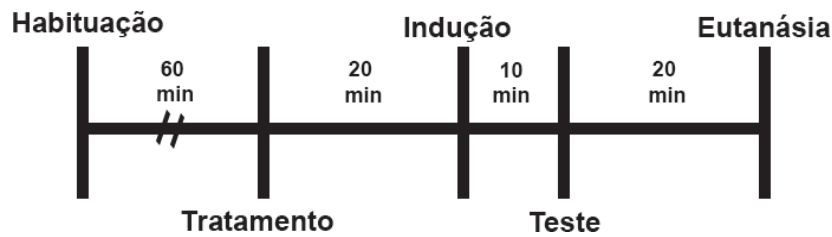
No último dia, o dia do teste (Figura 4), os animais foram levados a sala de experimentação e ficaram durante uma hora para aclimatação. Os animais receberam inicialmente uma injeção de tratamento, sendo ela veículo ou PRO (15 ou 30 mg/kg via s.c.) ou haloperidol (0.2 mg/kg via i.p.) 30 min antes do início do teste. Decorridos 20 min, os animais receberam uma injeção de indução, sendo SAL ou ANF 2,5 mg/kg via i.p.. Passados então mais 10 min o teste foi iniciado. O animal foi colocado na caixa de atividades durante 20 min, sendo gravados a atividade em vídeo e áudio para posteriores análises. Após esse período os animais foram retirados e levados para eutanásia.

FIGURA 3 - LINHA DO TEMPO EXPERIMENTAL



Linha do tempo dos dias de experimentação. Fonte: O autor (2020)

FIGURA 4 - PROTOCOLO EXPERIMENTAL DO DIA DO TESTE



Protocolo realizado com os tempos de administração das drogas utilizadas. Fonte: O autor (2020)

## 4.5 TESTES COMPORTAMENTAIS

### 4.5.1 Vocalizações Ultrassônicas (USV)

A emissão das USV de 50-kHz foram gravadas juntamente ao teste na caixa de atividade. Foi utilizado um microfone apropriado para a captura das USV, o UltraSoundGate Condenser Microphone CM16 (Avisoft Bioacoustics, Berlim, Alemanha), posicionado a 45 cm do chão. Este microfone é sensível a frequências entre 15-180 kHz. As USV foram gravadas utilizando o *software* RECORDER (versão 2.95; Avisoft Bioacoustics, Berlim, Alemanha) e posteriormente analisadas. A gravação do audio dos animais foi transferidas para o *software* Avisoft SASLab Pro (versão 4.34; Avisoft Bioacoustics, Berlim, Alemanha) que produz um espectrograma (com frequência de 488 Hz e resolução de 0.512 ms) das USV emitidas. As USV então são analisadas utilizando este espectrograma manualmente. Nesta análise foram avaliados os primeiros 20 segundos de cada minuto (ENGELHARDT *et al.*, 2017) da gravação de 20 min do teste. Durante esses 20 segundos foram contadas o número de USV, categorizado as USV entre os quatro principais subtipos (*Flat-call*, *Trill*, *Step-call* ou *Mixed*) e contabilizada a duração das USV.

### 4.5.2 Locomoção e Rearing

O teste foi realizado em uma caixa de acrílico (40 x 40 x 50 cm) forrada com cepilho juntamente com a gravação das USV em uma sala em luminosidade de 4 lux durante 20 min (PEREIRA *et al.*, 2014). O comportamento foi registrado por uma

câmera posicionada acima da caixa, de forma a se obter uma de uma visão superior da mesma. Para a análise da locomoção, foi colocada uma grade virtual sobre o vídeo e foi feita a contagem de cruzamentos das linhas que separam as seções da caixa (Figura 5). Já para o comportamento exploratório foi contabilizado a quantidade de *rearings* (comportamento em que o animal fica de pé nas duas patas traseiras). (DE OLIVEIRA GUAITAi *et al.*, 2018; PEREIRA *et al.*, 2014). Assim como para as USV, a análise desses comportamentos foi feita durante os primeiros 20 seg de cada minuto dos 20 min totais de teste.

FIGURA 5 - ILUSTRAÇÃO DA CAIXA DE ATIVIDADE

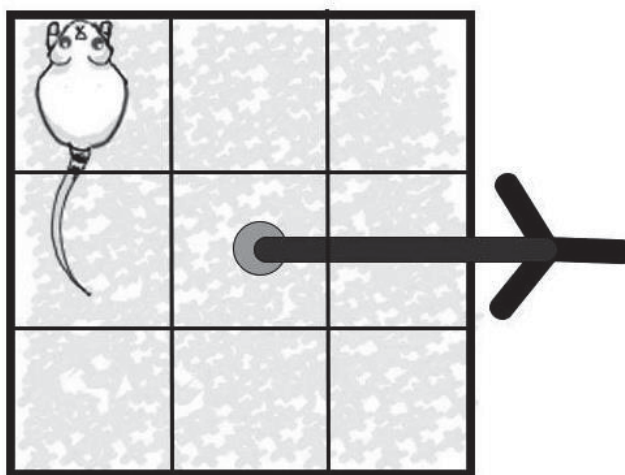


Ilustração de como é visualizado o teste de campo aberto, também é mostrado o posicionamento do microfone de gravação de USV. Fonte: O autor (2020)

#### 4.5.3 Comportamento estereotipado

O comportamento estereotipado foi avaliado juntamente da análise de locomoção e exploração. Foi utilizada a escala de estereotipia proposta por Ellinwood Jre Balster (1974), elaborada com animais psicoestimulados com ANF, como mostrada na Tabela 2. Assim como os demais comportamentos, foram analisados os primeiros 20 segundos de cada minuto, sendo considerada a pontuação do comportamento mais predominante durante o tempo estipulado.

TABELA 2 - ESCALA DE ESTEREOTIPIA

Pontuação	Comportamento
1	Animal deitado de olhos fechados e/ou dormindo
2	Animal inativo, deitado de olhos abertos
3	Animal realizando atividades no local, como grooming normal, comendo, bebendo, roendo levemente a caixa (quando aplicável).
4	Animal alerta em nível normal, ativo, andando pela caixa, cheirando, fazendo rearing, explorando em nível normal.
5	Animal hiperativo com mudanças rápidas de lugar
6	Animal com padrão lento porém repetitivo de exploração com níveis normais de atividade locomotora
7	Animal com padrão rápido e repetitivo de exploração, apresentando hiperatividade, correndo pela caixa.

Escala de comportamento estereotipado, com a pontuação e comportamento referente utilizados.

Fonte: Adaptado de Ellinwood e Balster (1974).

#### 4.6 EUTANÁSIA

Após os testes comportamentais, os animais foram anestesiados com Hidrato de Cloral 15% no volume de 1 ml via i.p., após aproximadamente 10 min foi testado o estado de anestesia (avaliação do reflexo de retirada de pata). Caso negativo, o animal recebia mais um pouco do anestésico (até 0.5 ml). Quando confirmada a anestesia, foi feita a eutanásia com o auxílio de uma guilhotina.

#### 4.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados foram analisados a partir do 5 min de gravação, uma vez que foi considerado como tempo de habituação os minutos iniciais. Eles estão expressos com a média + erro padrão da média (EPM). Todos os dados foram analisados utilizando o software STATISTICA 7.0 (StatSoft, Inc. Tulsa, EUA). Os dados foram analisados através de ANOVA de duas vias, seguidos do post-hoc de Newman-Keuls. Os dados de *rearing* e duração média das USV não apresentavam



homocedasticidade (avaliado pelo teste de Levene com  $p < 0.001$ ) e, desta forma, foi necessário uma transformação logarítmica  $[\log(\text{dado bruto} + 1)]$ . Após a transformação, eles apresentaram homocedasticidade (avaliado pelo teste de Levene com  $p > 0.05$ ), e foram analisados através da ANOVA de duas vias tendo como fatores indução (veículo ou anfetamina) e tratamento (veículo, PRO 15 e 30 ou haloperidol). Para a significância estatística, foi considerado o  $p < 0.05$ . Os gráficos foram elaborados utilizando o software Graphpad Prism 8.0.2 (Graphpad Software, EUA).

#### 4.8 ASPECTOS ÉTICOS

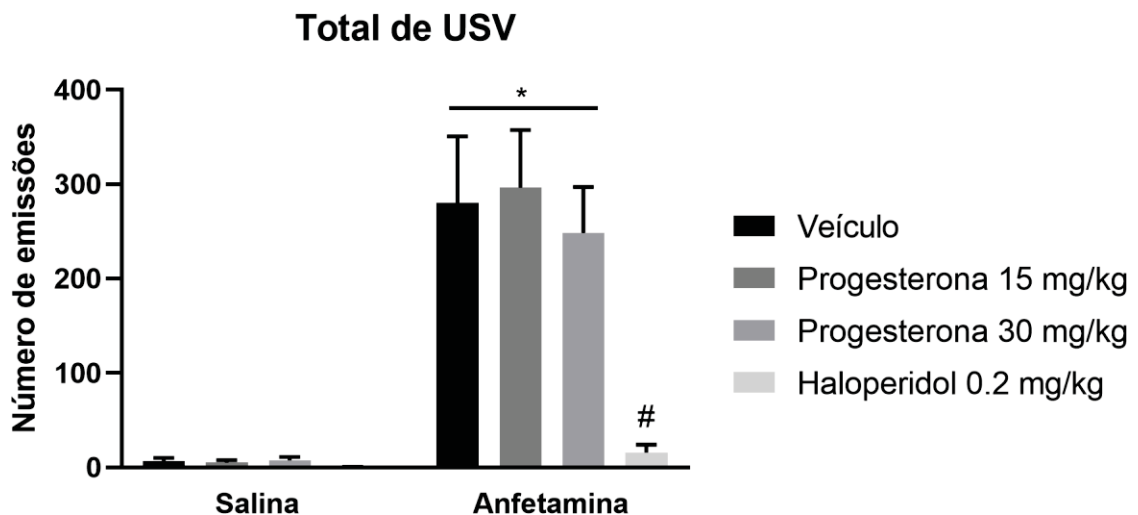
Esse trabalho realizado seguiu o projeto aprovado pela Comissão de Ética de uso de animais da UFPR (protocolo nº 1256) e os experimentos deste estudo foram realizados de acordo com as normas do CONCEA (Concelho Nacional de Controle e Exterimentação Animal)

## 5 RESULTADOS

### 5.1 AVALIAÇÃO DAS USV DE 50-KHZ

O número total de USV está apresentado no Gráfico 1. A análise mostrou que houve um efeito significativo na questão de indução ( $F_{1,3} = 31.62$ ,  $p < 0.001$ ), tratamento ( $F_{3,83} = 5.63$ ,  $p < 0.05$ ) e para a interação dos fatores ( $F_{3,83} = 3.045$ ,  $p < 0.05$ ). Não foi observada diferença entre grupos que receberam SAL nesse parâmetro (todos apresentaram  $p > 0.05$ ). A ANF levou a um aumento no total de emissões quando comparado ao grupo SAL ( $p < 0.001$ ), já o tratamento com PRO (grupos ANF/PRO 15 e ANF/PRO 30) não reduziu este aumento causado pela ANF (com  $p < 0.02$  comparado com grupo SAL/VEI). Contudo, o tratamento com haloperidol bloqueou o aumento da emissão de USV (apresentando  $p > 0.05$  comparado ao grupo SAL/VEI e um  $p < 0.05$  comparado ao grupo ANF/VEI).

GRÁFICO 1 - TOTAL DE USV

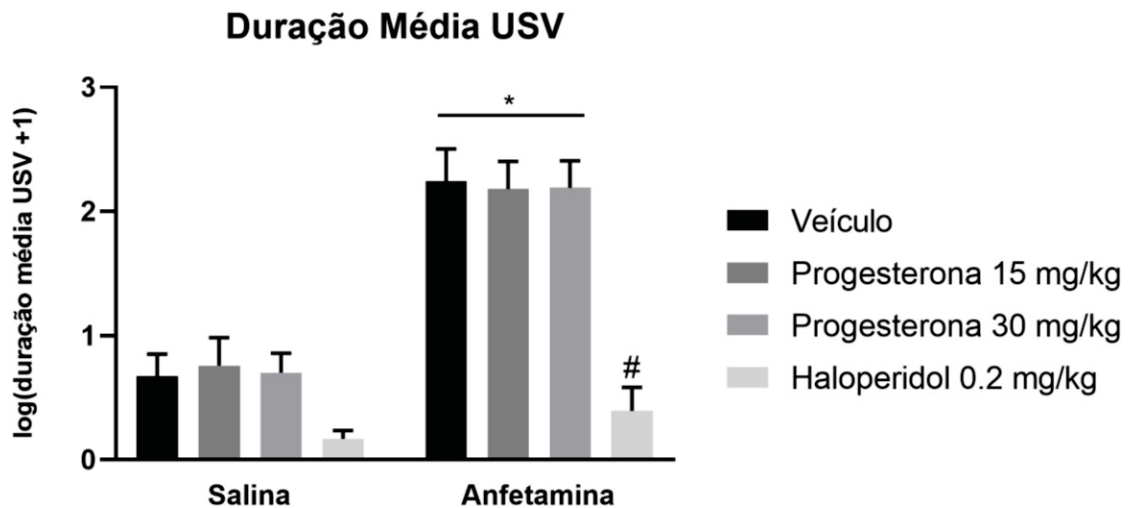


Efeito do tratamento com Progesterona e Haloperidol na emissão de USV de 50-kHz induzidas por anfetamina (duração do teste de 20 min). Número de USV de 50-kHz emitidas durante o teste. Dados representados com a média + EPM ( $n = 9-13$  ratos/ grupo); \*  $p < 0.05$  comparado ao grupo SAL/VEI; #  $p < 0.05$  comparado ao grupo ANF/VEI. Fonte: O autor (2020).

No Gráfico 2 são apresentados os resultados da análise da duração média das USV. Pela análise foi observada um efeito significativo da indução ( $F_{1,3} =$

62,114,  $p < 0,001$ ), do tratamento ( $F_{3,83} = 14,429$ ,  $p < 0,001$ ) e também na interação dos fatores ( $F_{3,83} = 4,220$ ,  $p < 0,01$ ).

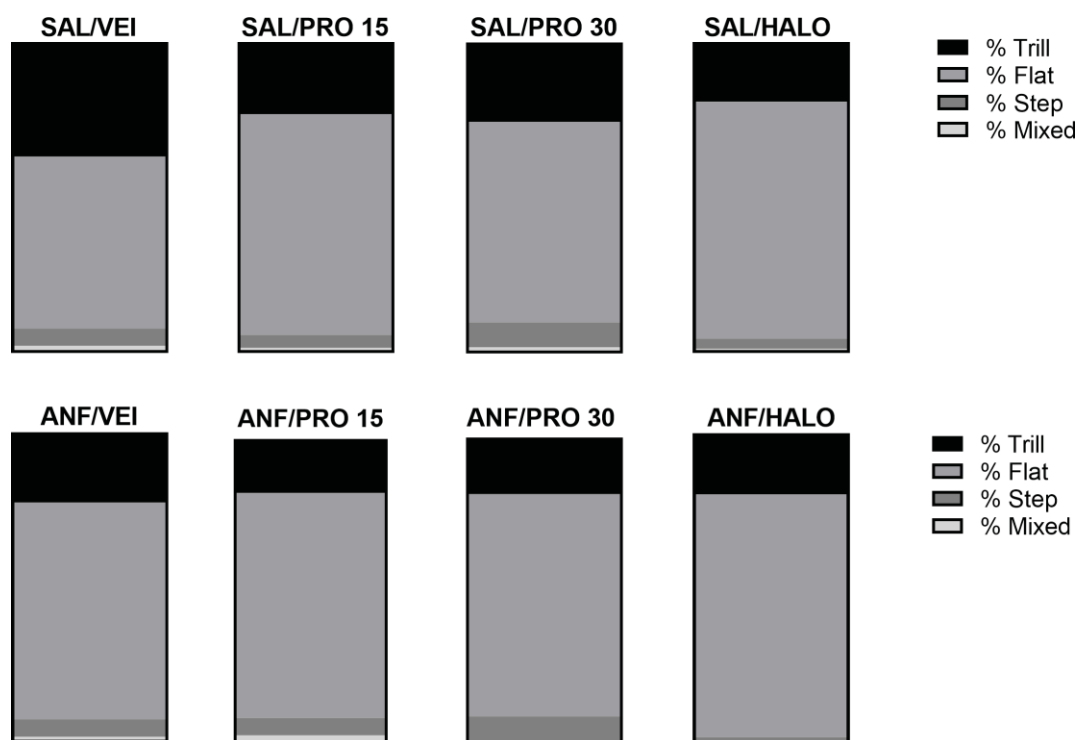
GRÁFICO 2 - DURAÇÃO MÉDIA DE VOCALIZAÇÃO



Efeito do tratamento com Progesterona e Haloperidol na duração média das USV de 50-kHz induzidas por anfetamina. Duração média das vocalizações (dado original medido em milissegundos). Dados representados com a média + EPM ( $n = 9-13$  ratos/ grupo); \*  $p < 0.05$  comparado ao grupo SAL/VEI; #  $p < 0.05$  comparado ao grupo ANF/VEI. Fonte: O autor (2020).

Para a avaliação do perfil dos subtipos de USV, a porcentagem de cada um deles é mostrada no Gráfico 3. A análise feita não mostrou efeito significativo para indução (trill:  $F_{1,3} = 2,854$ , NS; flat:  $F_{1,3} = 2,287$ , NS; step:  $F_{1,3} = 0,001$ , NS mixed:  $F_{1,3} = 0,126$ , NS), tratamento (trill:  $F_{3,71} = 1,756$ , NS; flat:  $F_{3,71} = 2,337$ , NS; step:  $F_{3,71} = 2,302$ , NS mixed:  $F_{1,3} = 1,522$ , NS) e interação indução-tratamento (trill:  $F_{1,3} = 0,261$ , NS; flat:  $F_{1,3} = 0,239$ , NS; step:  $F_{1,3} = 0,249$ , NS mixed:  $F_{1,3} = 0,548$ , NS). Isto indica que o perfil foi similar em todos os grupos analisados.

GRÁFICO 3 - PERFIL DE EMISSÃO DOS SUBTIPOS DE USV

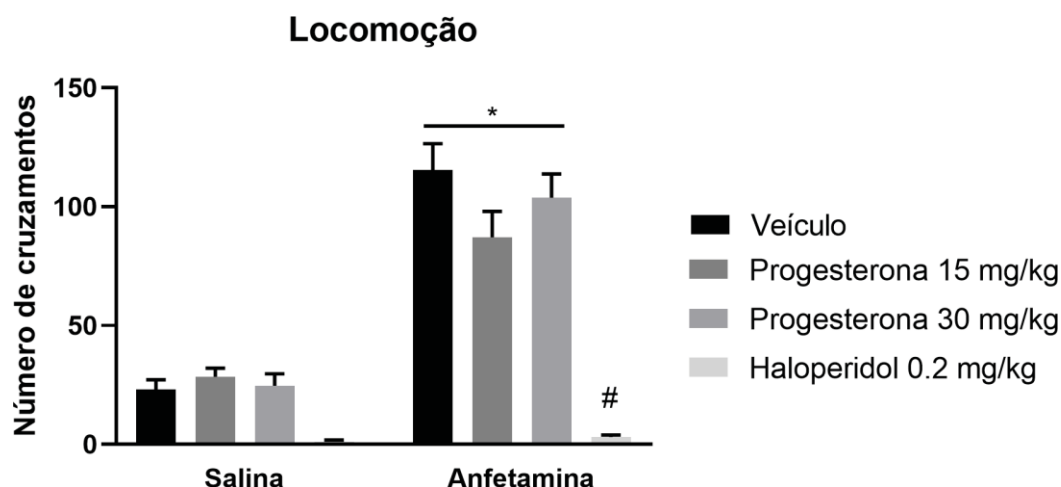


Efeito do tratamento com Progesterona e Haloperidol no perfil dos subtipos emitidos das USV de 50-kHz induzidas por anfetamina. Proporção (%) dos subtipos de USV (Flat, Trill, Step e Mixed).  $n = 9-13$  ratos/ grupo. Fonte: O autor (2020).

## 5.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE MOTORA

No Gráfico 4 estão os resultados da análise de atividade locomotora dos animais. É observado um efeito significativo da indução ( $F_{1,3} = 76.072$ ,  $p < 0.001$ ), tratamento ( $F_{3, 83} = 19.891$ ,  $p < 0.001$ ) e interação indução-tratamento ( $F_{3,83} = 18.519$ ,  $p < 0.001$ ). Não é observada diferença no comportamento entre os grupos SAL (todos com  $p > 0.05$ ). A indução com ANF (grupo ANF/VEI) levou a um aumento significativo ( $p < 0.001$ ) do número de cruzamentos em relação ao seu grupo controle (SAL/VEI). Novamente, o tratamento com PRO (ANF/PRO 15 e 30 não preveniu o aumento da atividade (ambas doses com  $p < 0.001$  comparado ao SAL/VEI e  $p > 0.05$  comparado ao ANF/VEI). Já o tratamento com haloperidol (ANF/HALO) impediu a hiperlocomoção induzida pela ANF (apresentando um  $p < 0.001$  em relação ao ANF/VEI e um  $p > 0.05$  comparado ao SAL/VEI).

GRÁFICO 4 - ANÁLISE DA ATIVIDADE LOCOMOTORA

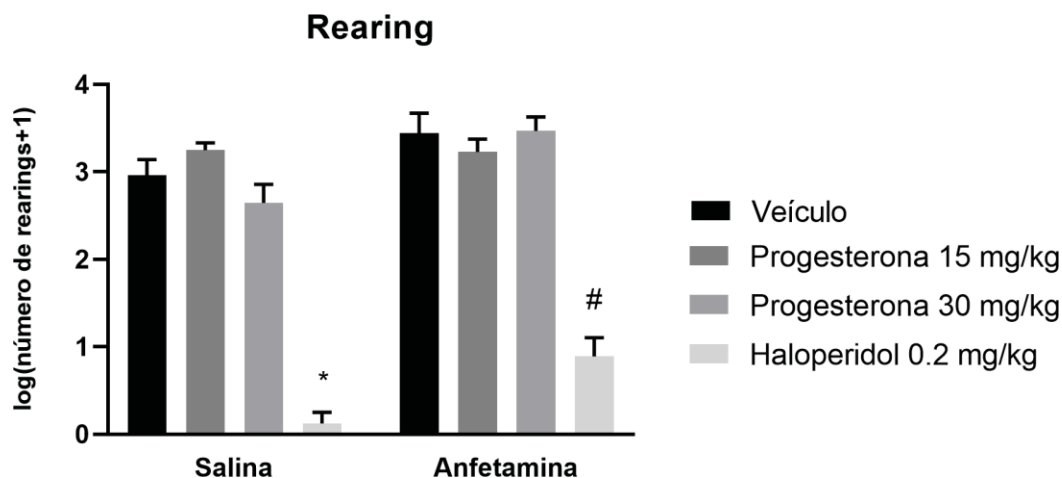


Efeito da progesterona e do haloperidol na atividade locomotora induzida por anfetamina (duração do teste de 20-min). Número de cruzamentos realizados. Dados representados com a média + EPM (n = 9-13 ratos/ grupo); \*  $p < 0.05$  comparado ao grupo SAL/VEI; #  $p < 0.05$  comparado ao grupo ANF/VEI. Fonte: O autor (2020).

### 5.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE EXPLORATÓRIA

Os resultados do comportamento exploratório (*rearing*) estão demonstrados no Gráfico 5. A análise apontou um efeito significativo da indução ( $F_{1,3} = 17.766$ ,  $p < 0.001$ ), tratamento ( $F_{3,83} = 109.398$ ,  $p < 0.001$ ) e interação indução-tratamento ( $F_{3,83} = 2.798$ ,  $p < 0.05$ ). A indução com ANF não aumentou o número de *rearings* ( $p > 0.05$  comparada ao SAL/VEI). O tratamento com PRO (15 ou 30) não levou a nenhuma alteração (com  $p > 0.05$  comparado ao SAL/VEI ou ANF/VEI). Contudo, foi observado que o tratamento com haloperidol reduziu o comportamento em ambas situações (SAL e ANF apresentando o  $p < 0,05$  comparado aos tratamentos veículo).

GRÁFICO 5 - ATIVIDADE EXPORATÓRIA (REARING)



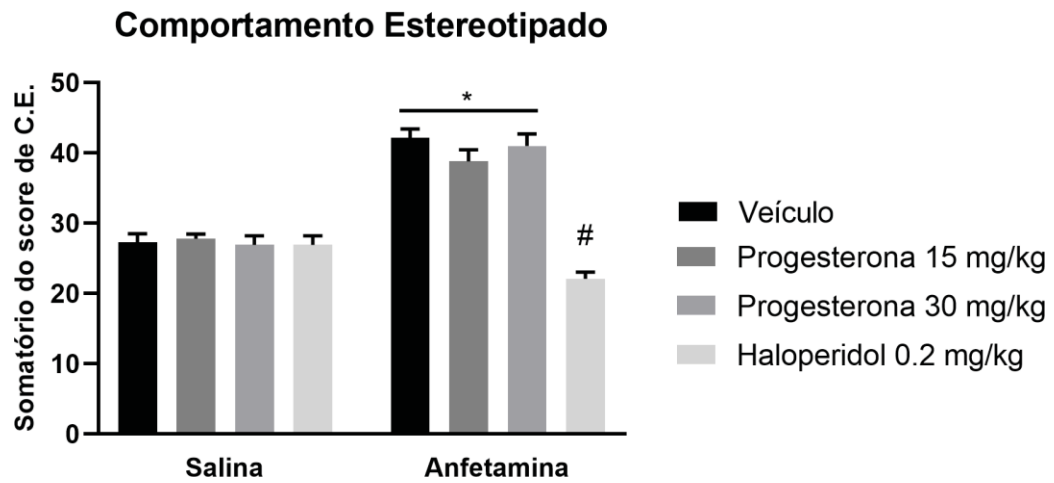
Efeito da progesterona e do haloperidol na atividade exploratória induzida por anfetamina (duração do teste de 20-min). Dados mostrados com a transformação logaritmica do número total de *rearing* +1. Dados representados com a média + EPM (n = 9-13 ratos/ grupo); \*  $p < 0.05$  comparado ao grupo SAL/VEI; #  $p < 0.05$  comparado ao grupo ANF/VEI. Fonte: O autor (2020).

#### 5.4 AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO ESTEREOTIPADO

O Gráfico 6 apresenta os resultados do comportamento estereotipado. A análise mostrou uma mudança significativa na indução ( $F_{1,3} = 101.022$ ,  $p < 0.001$ ), tratamento ( $F_{3,83} = 26.444$ ,  $p < 0.001$ ) e interação desses fatores ( $F_{3,83} = 10.966$ ,  $p < 0.001$ ). Não foi observada diferença significativa entre os grupos SAL (todos apresentaram  $p > 0.05$ ). O tratamento com ANF para os grupos VEI e PRO (ANF/VEI, ANF/PRO 15 e 30) levou ao aparecimento de comportamento estereotipado ao se comparar com o grupo SAL/VEI (com  $p < 0.001$  para todos). Porém, o tratamento com haloperidol levou a um bloqueio da ação da ANF, pois não se observou aumento da estereotipia nesses animais ( $p > 0.05$  comparado ao SAL/VEI e  $p < 0.001$  comparado ao grupo ANF/VEI).



GRÁFICO 6 - AVALIAÇÃO DE COMPORTAMENTO ESTEREOTIPADO



Efeito da progesterona e do haloperidol no comportamento estereotipado induzido por anfetamina (duração do teste de 20 min). Somatório da pontuação (*score*) dos comportamentos dos animais. Dados representados com a média + EPM ( $n = 9-13$  ratos/ grupo); \*  $p < 0.05$  comparado ao grupo SAL/VEI; #  $p < 0.05$  comparado ao grupo ANF/VEI. Fonte: O autor (2020).

## 6 DISCUSSÃO

Os resultados apresentados nos levam a sugerir que o pré-tratamento agudo com progesterona, mesmo em uma dose alta (30 mg/kg), não bloqueou os efeitos da anfetamina sobre o comportamento de ratos machos.

A indução com ANF levou a algumas mudanças comportamentais relevantes. Primeiramente, foi observado um aumento significativo do total de USV. Este aumento já fora relatado em trabalhos realizados em nosso grupo de pesquisa utilizando doses próximas de ANF (2.5 - 3 mg/kg) (DE OLIVEIRA GUAITA *et al.*, 2018; PEREIRA *et al.*, 2014) e também foi observado na literatura, que descreve o mesmo aumento nas USVs na presença do psicoestimulante (KANIUGA *et al.*, 2016; RIPPBERGER *et al.*, 2015; TARACHA *et al.*, 2014). Essa mudança reforça a hipótese da relação entre a emissão de USV de 50-kHz e a liberação de monoaminas, como a DA. Além do aumento relatado, é possível inibir o efeito da ANF na presença de antagonistas dopaminérgicos (SCH 23390, SCH 39166, haloperidol, racloprida, clozapina, risperidona e pimozida) (SCARDOCHIO; CLARKE, 2013; THOMPSON; LEONARD; BRUDZYNSKI, 2006; WRIGHT; DOBOSIEWICZ; CLARKE, 2013). Em contrapartida, nossos testes mostraram um aumento do tempo médio de duração das vocalizações, resultado contrastante aos relatados na literatura (SIMOLA *et al.*, 2012; WRIGHT; DOBOSIEWICZ; CLARKE, 2013), os quais mostram que a duração média das USV de 50-kHz não é diferente entre grupos SAL e ANF. Outro resultado não esperado, foi a ausência de mudança no perfil de subtipos de USV, oposto ao relatado na literatura (PEREIRA *et al.*, 2014; WRIGHT; DOBOSIEWICZ; CLARKE, 2013). Segundo a literatura, o aumento de DA e NA está intimamente relacionado com o aumento na porcentagem de vocalizações tipo frequência modulada (trill, step e mixed). Uma vez que a administração de ANF leva a um aumento da atividade dopaminérgica e noradrenérgica, era esperado também uma mudança no perfil de emissões (em porcentagem) desses subtipos (BURGDORF; PANKSEPP; MOSKAL, 2011; KANIUGA *et al.*, 2016; SIMOLA *et al.*, 2012; WRIGHT; DOBOSIEWICZ; CLARKE, 2013). Contudo, observamos que o perfil entre os grupos salina e anfetamina não se diferenciaram mesmo na presença da droga.

Sobre os resultados observados na caixa de atividade, primeiramente vimos que a ANF levou os animais a um estado de hiperlocomoção, resultado semelhante

aos relatos na literatura (DE OLIVEIRA GUAITA *et al.*, 2018; PEREIRA *et al.*, 2014). A atividade locomotora está relacionada ao aumento de monoaminas, como a DA e NA, desta forma, a ANF é capaz de induzir o estado de hiperlocomoção (FRAY *et al.*, 1980; KELLY; IVERSEN, 1976; ROWLEY *et al.*, 2012). Observamos que na análise exploratória (através da contagem de *rearings*) os animais tratados com salina não se diferenciaram dos ANF. Este resultado não está de acordo com o esperado. Na literatura existem relatos do aumento de *rearings* na presença de ANF (FRAY *et al.*, 1980), sendo interpretado assim, como um aumento de exploração (ELLINWOOD; BALSTER, 1974), e que tal mudança comportamental é reversível na presença de antagonistas dopaminérgicos (HOFFMAN; BENINGER, 1985). Na análise de estereotipia, observamos que os nossos animais apresentaram comportamento estereotipado na presença da ANF, uma vez que foi observado um aumento na pontuação de estereotipia. De acordo com a literatura, a ANF é capaz de desencadear uma mudança sequencial no comportamento dos ratos (DE OLIVEIRA GUAITA *et al.*, 2018; ELLINWOOD; BALSTER, 1974). Iniciando com um aumento da atividade locomotora e depois para o aparecimento de comportamentos repetitivos, com hiperlocomoção, aumento de exploração e até a mudanças posturais anormais. Esta mudança de perfil comportamental é denominada como comportamento estereotipado (ELLINWOOD; BALSTER, 1974).

Apesar de algumas incoerências encontradas, o modelo ainda se mostrou sensível para a avaliação da atividade dopaminérgica uma vez que o controle positivo com HALO bloqueou os parâmetros avaliados. Assim como outros antagonistas D2 (eticoprida, racloprida, clozapina) (BARKER *et al.*, 2015; RINGEL *et al.*, 2013; WÖHR *et al.*, 2015; WRIGHT; DOBOSIEWICZ; CLARKE, 2013), o tratamento com HALO levou a uma redução do efeito da ANF nas USV, reduzindo tanto o número quanto a duração das mesmas. Como relatado na literatura (DE OLIVEIRA GUAITA *et al.*, 2018; DELFS; KELLEY, 1990), o tratamento com HALO também impediu que os animais apresentassem um comportamento estereotipado na presença da ANF, fazendo com que os animais deste grupo tivessem uma pontuação semelhante aos animais salina. Contudo, ao analisar os resultados de exploração e locomoção, observa-se que os animais que receberam HALO e SAL apresentaram um número inferior aos controles de cruzamentos e *rearings*. Esses valores nos levam a sugerir que os animais possivelmente estavam com a capacidade locomotora prejudicada, o que poderia refletir um potencial estado de

sedação. Dessa forma, apesar da dose utilizada (0.2 mg/kg) ser indicada e descrita na literatura como eficaz para bloquear a ação da ANF sem causar sedação (WRIGHT; DOBOSIEWICZ; CLARKE, 2013), observamos em nossos animais uma potencial sedação.

O tratamento com PRO em ambas as doses avaliadas foi ineficaz para bloquear o efeito da ANF em todos os parâmetros comportamentais. Contudo, apesar de ser um resultado oposto a hipótese inicial, já foi relatado na literatura (REED; LEVIN; EVANS, 2010) um estudo clínico de pré-tratamento com progesterona para avaliação dos efeitos da anfetamina em mulheres não usuárias. Neste trabalho, foram observados os efeitos do pré-tratamento com PRO (capsulas de 200 mg) sobre a ação da ANF (capsulas de 10 ou 20 mg) através de questionários para avaliação subjetiva dos efeitos da droga, assim como avaliações de impulsividade, desempenho em tarefas e outros aspectos. Como resultado, os autores observaram que o tratamento com PRO, de forma geral, sobre os efeitos da ANF não foram diferentes do efeito de um tratamento placebo. Dessa forma, apesar de ser um protocolo diferente (em humanos e através de análises subjetivas) do que utilizamos, é um relato válido que evidencia o mesmo efeito em outra espécie.

Todavia, apesar dos resultados não promissores com ANF, foi relatado na literatura uma melhora de alguns aspectos relacionados à dependência de cocaína, que seria um psicoestimulante que atua na mesma região sináptica da ANF. Em estudos pré-clínicos foi observado que um tratamento com PRO ou ALO levou a uma redução de comportamentos de dependência em cocaína, como a redução de auto-administração de cocaína em ratos (JACKSON; ROBINSON; BECKER, 2006), redução do comportamento de busca pela droga (ANKER *et al.*, 2007, 2009; FELTENSTEIN *et al.*, 2009) e de escolha impulsiva induzida pelo psicoestimulante (SMETHELLS *et al.*, 2016; SWALVE *et al.*, 2017). Ainda foi observado em testes clínicos uma redução das sensações relacionadas ao *craving* (MILIVOJEVIC *et al.*, 2016) e outros aspectos relacionados à droga (ANKER; CARROLL, 2010; PELTIER; SOFUOGLU, 2018). Contudo, diferente da nossa análise, os experimentos utilizavam doses diferentes de PRO para o tratamento, assim como, foram feitas administrações repetidas do fármaco, com pelo menos 3 dias de tratamento. Ainda os estudos apontam uma maior eficiência de tratamento para o sexo feminino, o que sugere que o efeito da progesterona seria sexo dependente.

Desta forma, três possibilidades poderiam explicar o que foi observado em nosso estudo. Primeiramente, o mecanismo de ação da cocaína e da ANF pode ser um fator relevante. Apesar de ambas as drogas aumentarem a concentração de monoaminas na fenda sináptica (VOLKOW *et al.*, 2004), o mecanismo de ação é diferente. A cocaína bloqueia diretamente o DAT, impedindo a recaptação de DA na fenda sináptica (VERMA, 2015), enquanto a ANF leva a um efluxo de DA através do DAT (MAUNA *et al.*, 2019). Entretanto, essa hipótese teria como falha a ação da alopregnanolona no receptor GABA-A ocorrer em uma região diferente e independe do que acontece na sinapse dopaminérgica (QUINONES-JENAB; JENAB, 2010). Uma segunda possibilidade, seria o funcionamento da PRO ser sexo-dependente. Apesar da PRO também ser produzida no sexo masculino (SCHUMACHER *et al.*, 2014), os estudos com cocaína revelam que a ação da PRO é mais evidente em fêmeas. Ainda, estudos indicam que a ação da PRO seja dependente de estrogênio (ANKER *et al.*, 2009; ANKER; CARROLL, 2010; JACKSON; ROBINSON; BECKER, 2006). Dessa forma, uma vez que utilizamos animais machos para avaliação, não seria possível observar um efeito. Por último, uma terceira possibilidade, como os efeitos em estudos com cocaína foram perceptíveis em protocolos de administrações repetidas, a avaliação que fizemos não gerou efeitos por ser única e aguda. Porém, a principal teoria de funcionamento da PRO na regulação dopaminérgica é descrita como um efeito como modulador alostérico de um receptor acoplado a canal iônico (GABA-A), ou seja, de resposta rápida (ANKER; CARROLL, 2010; QUINONES-JENAB; JENAB, 2010; SCHUMACHER *et al.*, 2014). Desta forma, não seria necessária uma administração repetida para ser observado o efeito, pois não requeriria um tratamento prolongado para induzir uma regulação e expressão gênica, sendo uma ação pontual. Assim como já foi relatado o efeito de benzodiazepínicos (DE OLIVEIRA GUAITA *et al.*, 2018; RUSH *et al.*, 2004) regulando a ação da ANF através do mesmo receptor e utilizando protocolos de administração aguda.

A partir das três possibilidades apontadas, o mecanismo de ação proposto não parece ser capaz de explicar o que foi observado. Se o mecanismo de ação através do GABA fosse realmente o único responsável pelo controle da liberação de monoaminas, o protocolo realizado (utilizando machos, em administração aguda e com os testes feitos) evidenciaria o efeito esperado. Contudo, é possível encontrar na literatura outras hipóteses por trás do funcionamento da PRO na regulação de

monoaminas. Além dos receptores GABA-A, a progesterona e seus metabólitos atuam em receptores como PRA, PRB e sigma (ROMIEU *et al.*, 2003; SCHUMACHER *et al.*, 2014). Esses receptores dependem de mais tempo para ter sua ação fisiológica evidenciada, pois são associados a expressão gênica e controle de outras proteínas (ANKER; CARROLL, 2010; GUENNOUN *et al.*, 2015; SCHUMACHER *et al.*, 2014). Já, considerando a possível ação ser sexo dependente, os estudos apontam que existe uma possibilidade da ação da PRO ser dependente de estrogênio, contudo os dados ainda não são conclusivos (ANKER; CARROLL, 2010; QUINONES-JENAB; JENAB, 2010).

Desta forma, observamos que o tratamento com a PRO não foi capaz de bloquear as mudanças comportamentais induzidas pela ANF em ratos machos. Este resultado observado pode estar relacionado primeiramente ao psicoestimulante utilizado, pois talvez sua ação não seja capaz de ser bloqueada pela PRO. Outro ponto relevante é a dose e protocolo de administração escolhidos, pois a ação da PRO pode depender de uma exposição prolongada para ser evidenciada. Por último, a utilização de machos pode ter sido crucial para o resultado, uma vez que a ação da progesterona pode ser dependente de estrogênio e seria sensível somente em fêmeas. Com estes pontos, acreditamos que ainda são necessários mais estudos para elucidar o efeito da PRO como um potencial tratamento auxiliar para dependência de psicoestimulantes.

## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base em nossos experimentos e estudos prévios da literatura, podemos afirmar que o pré-tratamento com progesterona é ineficaz em bloquear os efeitos da anfetamina no comportamento de ratos machos. Ainda acreditamos que o mecanismo proposto para a ação da PRO modulando a liberação dopaminérgica seja mais complexo do que se é proposto atualmente, indo além de uma inibição simples por modular os receptores GABA-A no cérebro.

### 7.1 RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Para trabalhos futuros, acreditamos que sejam necessárias avaliações do mecanismo de ação da PRO utilizando protocolos de tratamentos crônicos, assim como uma avaliação mais completa utilizando antagonistas e agonistas dos outros mecanismos propostos (receptores sigma, PRA e PRB). Também sugerimos a avaliação aguda do efeito da PRO em animais psicoestimulados com cocaína, afim de compreender se a diferença entre as drogas seria um fator para o funcionamento ou não do tratamento. E claro, acima de tudo, fazer mais avaliações utilizando fêmeas, com monitoramento de ciclo estral e avaliação do efeito isolado da PRO.

## REFERÊNCIAS

ANKER, Justin J. et al. Effects of Progesterone on the Reinstatement of Cocaine-Seeking Behavior in Female Rats. **Experimental and Clinical Psychopharmacology**, Minneapolis, v. 15, n. 5, p. 472–480, 2007.

ANKER, Justin J. et al. Effects of allopregnanolone on the reinstatement of cocaine-seeking behavior in male and female rats. **Psychopharmacology**, Minneapolis, v. 203, n. 1, p. 63–72, 2009.

ANKER, Justin J.; CARROLL, Marilyn E. The role of progestins in the behavioral effects of cocaine and other drugs of abuse: Human and animal research. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, Minneapolis, v. 35, n. 2, p. 315–333, 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neubiorev.2010.04.003>

ANKER JUSTIN J., J. J.; CARROLL, Marilyn E. Sex differences in the effects of allopregnanolone on yohimbine-induced reinstatement of cocaine seeking in rats. **Drug and Alcohol Dependence**, Minneapolis, v. 107, n. 2–3, p. 264–267, 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2009.11.002>

BARKER, David J. et al. Ultrasonic vocalizations: Evidence for an affective opponent process during cocaine self-administration. **Psychopharmacology**, Piscataway, v. 231, n. 5, p. 909–918, 2014.

BARKER, David; SIMMONS, Steven; WEST, Mark. Ultrasonic Vocalizations as a Measure of Affect in Preclinical Models of Drug Abuse: A Review of Current Findings. **Current Neuropharmacology**, Piscataway, v. 13, n. 2, p. 193–210, 2015.

BEAUCHAMP, Miriam H. et al. Neurosteroids and reward : allopregnanolone produces a conditioned place aversion in rats. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, Kingston, v. 67, p. 29–35, 2000.

BRUDZYNSKI, Stefan M. et al. Effects of intraaccumbens amphetamine on production of 50kHz vocalizations in three lines of selectively bred Long-Evans rats. **Behavioural Brain Research**, St. Catharines, v. 217, n. 1, p. 32–40, 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2010.10.006>

BRUDZYNSKI, Stefan M. Pharmacology of Ultrasonic Vocalizations in adult Rats: Significance, Call Classification and Neural Substrate. **Current Neuropharmacology**, St. Catharines, p. 180–192, 2015.

BUCK, Cara L. et al. Dopamine D1 and  $\mu$ -opioid receptor antagonism blocks anticipatory 50 kHz ultrasonic vocalizations induced by palatable food cues in Wistar rats. **Psychopharmacology**, La Jolla, v. 231, n. 5, p. 929–937, 2014.

BURGDORF, Jeffrey; PANKSEPP, Jaak; MOSKAL, Joseph R. Frequency-modulated 50kHz ultrasonic vocalizations: A tool for uncovering the



molecular substrates of positive affect. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, Evanston, 43 v. 35, n. 9, p. 1831–1836, 2011.

BURKE, Candace J. et al. Specific 50-kHz vocalizations are tightly linked to particular types of behavior in juvenile rats anticipating play. **PLoS ONE**, Lethbridge, v.12. n. 5. p. 1–20, 2017.

CARROLL, Marilyn E.; ANKER, Justin J. Sex differences and ovarian hormones in animal models of drug dependence. **Hormones and Behavior**, Minneapolis, v. 58, n. 1, p. 44–56, 2010.

DE OLIVEIRA GUAITA, Gisele et al. Diazepam blocks 50 kHz ultrasonic vocalizations and stereotypies but not the increase in locomotor activity induced in rats by amphetamine. **Psychopharmacology**, Curitiba, v. 235, n. 7, p. 1887–1896, 2018.

DELFS, J. M.; KELLEY, A. E. The role of D1 and D2 dopamine receptors in oral stereotypy induced by dopaminergic stimulation of the ventrolateral striatum. **Neuroscience**, Cambridge, v. 39, n. 1, p. 59–67, 1990.

DI CHIARA, G.; IMPERATO, A. Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Cagliari, v. 85, n. 14, p. 5274–5278, 1988.

ELLINWOOD, E. H.; BALSTER, R. L. Rating the behavioral effects of amphetamine. **European Journal of Pharmacology**, Durham, v. 28, p. 35–41, 1974.

ENGELHARDT, K. et al. Effects of amphetamine on pro-social ultrasonic communication in juvenile rats: Implications for mania models. **European Neuropsychopharmacology**, Marburg, v. 27, n. 3, p. 261–273, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.euroneuro.2017.01.003>

EVANS, Suzette M. The Role of Estradiol and Progesterone in Modulating the Subjective Effects of Stimulants in Humans. **Experimental and Clinical Psychopharmacology**, New York, v. 15, n. 5, p. 418–426, 2007.

FELTENSTEIN, Matthew W. et al. Attenuation of cocaine-seeking by progesterone treatment in female rats. **Psychoneuroendocrinology**, Charleston, v. 34, n. 3, p. 343–352, 2009.

FRAY, P. J. et al. An observational method for quantifying the behavioural effects of dopamine agonists: Contrasting effects of d-Amphetamine and apomorphine. **Psychopharmacology**, Cambridge, v. 69, n. 3, p. 253–259, 1980.

GUENNOUN, R. et al. Progesterone and allopregnanolone in the central nervous system: Response to injury and implication for neuroprotection. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, Kremlin-Bicêtre, v. 146, p. 48–61, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jsbmb.2014.09.001> 44

HEAL, David J. et al. Amphetamine, past and present - A pharmacological and clinical perspective. **Journal of Psychopharmacology**, Nottingham, v. 27, n. 6, p. 479–496, 2013.

HOFFMAN, Diane C.; BENINGER, Richard J. The D1 dopamine receptor antagonist, SCH 23390 reduces locomotor activity and rearing in rats. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, Kingston, v. 22, n. 2, p. 341–342, 1985.

JACKSON, Lisa R.; ROBINSON, Terry E.; BECKER, Jill B. Sex differences and hormonal influences on acquisition of cocaine self-administration in rats. **Neuropsychopharmacology**, Ann Arbor, v. 31, n. 1, p. 129–138, 2006.

KANIUGA, Ewelina et al. Rats showing low and high sensitization of frequency-modulated 50-kHz vocalization response to amphetamine differ in amphetamine-induced brain Fos expression. **Brain Research**, Warsaw, v. 1648, p. 356–364, 2016.

KELLY, Peter H.; IVERSEN, Susan D. Selective 6OHDA-induced destruction of mesolimbic dopamine neurons: Abolition of psychostimulant-induced locomotor activity in rats. **European Journal of Pharmacology**, Cambridge, v. 40, n. 1, p. 45–56, 1976.

KNUTSON, Brian. Ultrasonic Vocalizations as Indices of Affective States in Rats. **Psychological Bulletin**, Stanford, v. 128, n. 6, p. 961–977, 2002.

KNUTSON, Brian; BURGDORF, Jeffrey; PANKSEPP, Jaak. High-Frequency Ultrasonic Vocalizations Index Conditioned Pharmacological Reward in Rats. **Physiology & Behavior**, Bethesda, v. 66, n. 4, p. 639–643, 1999.

KOOB, George F.; VOLKOW, Nora D. Neurocircuitry of addiction. **Neuropsychopharmacology**, La Jolla, v. 35, n. 1, p. 217–238, 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/npp.2009.110>

KREEK, Mary Jeanne; LAFORGE, K. Steven; BUTELMAN, Eduardo. Pharmacotherapy of addictions. **Nature Reviews Drug Discovery**, New York, v. 1, n. 9, p. 710–726, 2002.

LAMBERT, J. J. et al. Actions of synthetic and endogenous steroids on the receptor. **TIPS**, Duende, p. 224–227, 1987.

LEE, Nicole K. et al. Pharmacotherapy for amphetamine dependence: A systematic review. **Drug and Alcohol Dependence**, Bentley, v. 191, n. August, p. 309–337, 2018.

LYNCH, Wendy J. Modeling the development of drug addiction in male and female animals. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, Charlottesville, v. 164, n. March 2017, p. 50–61, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2017.06.006> 45

MAHLER, Stephen V. et al. A rodent “self-report” measure of methamphetamine craving? Rat ultrasonic vocalizations during methamphetamine self-administration, extinction, and reinstatement. **Behavioural Brain Research**, Charleston, v. 236, n. 1, p. 78–89, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2012.08.023>

MAIER, Esther Y. et al. The missing variable : ultrasonic vocalizations reveal hidden sensitization and tolerance-like effects during long-term cocaine administration. **Psychopharmacology**, Austin, p. 1141–1152, 2012.

MAUNA, J. C. et al. G protein  $\beta\gamma$  subunits play a critical role in the actions of amphetamine. **Translational Psychiatry**, Pittsburgh, 2019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41398-019-0387-8>

MILIVOJEVIC, Verica et al. Effects of progesterone stimulated allopregnanolone on craving and stress response in cocaine dependent men and women. **Psychoneuroendocrinology**, New Haven, v. 65, p. 44–53, 2016.

NUTT, David J. et al. The dopamine theory of addiction: 40 years of highs and lows. **Nature Reviews Neuroscience**, London, v. 16, n. 5, p. 305–312, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nrn3939>

PELTIER, MacKenzie R.; SOFUOGLU, Mehmet. Role of Exogenous Progesterone in the Treatment of Men and Women with Substance Use Disorders: A Narrative Review. **CNS Drugs**, New Haven, p. 1–15, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s40263-018-0525-5>

PEREIRA, Marcela et al. Amphetamine-induced appetitive 50-kHz calls in rats : a marker of affect in mania ? **Psychopharmacology**, Curitiba, p. 2567–2577, 2014.

QUINONES-JENAB, Vanya; JENAB, Shirzad. Progesterone attenuates cocaine-induced responses. **Hormones and Behavior**, New York, v. 58, n. 1, p. 22–32, 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.yhbeh.2009.10.002>

REAGAN-SHAW, Shannon; NIHAL, Minakshi; AHMAD, Nihal. Dose translation from animal to human studies revisited. **FASEB Journal**, Wisconsin, v. 22, n. 3, p. 659–661, 2008.

REED, Stephanie C.; LEVIN, Frances R.; EVANS, Suzette M. Hormones and Behavior The effects of progesterone pretreatment on the response to oral D - amphetamine in Women. **Hormones and Behavior**, New York, v. 58, n. 3, p. 533–543, 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.yhbeh.2010.04.003>

REYNOLDS, Eric W.; BADA, Henrietta S. Pharmacology of drugs of abuse. **Obstet Gynecol Clin N Am**, Lexington, v. 30, p. 501–522, 2003.

RINGEL, Lauren E. et al. Dopamine D 1 and D 2 receptor antagonism effects on rat ultrasonic vocalizations. **Behavioural Brain Research**, Madison, v. 252, p. 252–259, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2013.06.006> 46

RIPPBERGER, Henrike et al. Environmental and Pharmacological Modulation of Amphetamine- Induced 50-kHz Ultrasonic Vocalizations in Rats. **Current Neuropharmacology**, Marburg, v. 13 p. 220–232, 2015.

ROMIEU, P. et al. Sigma 1 receptor-related neuroactive steroids modulate cocaine-induced reward. **J Neurosci**, Montpellier, v. 23, n. 9, p. 3572–3576, 2003.

ROWLEY, H. L. et al. Lisdexamfetamine and immediate release d-amphetamine - Differences in pharmacokinetic/pharmacodynamic relationships revealed by striatal microdialysis in freely-moving rats with simultaneous determination of plasma drug concentrations and locomotor activit. **Neuropharmacology**, Nottingham, v. 63, n. 6, p. 1064–1074, 2012.

RUSH, Craig R. et al. Alprazolam attenuates the behavioral effects of Damphetamine in humans. **Journal of Clinical Psychopharmacology**, Lexington, v. 24, n. 4, p. 410–420, 2004.

SCARDOCHIO, Tina; CLARKE, Paul B. S. Inhibition of 50-kHz ultrasonic vocalizations by dopamine receptor subtype-selective agonists and antagonists in adult rats. **Psychopharmacology**, Montreal, v. 226, n. 3, p. 589–600, 2013.

SCHUMACHER, M. et al. Revisiting the roles of progesterone and allopregnanolone in the nervous system: Resurgence of the progesterone receptors. **Progress in Neurobiology**, Kremlin-Bicêtre, v. 113, p. 6–39, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pneurobio.2013.09.004>

SIMOLA, Nicola et al. Neuropharmacology Pharmacological characterization of 50-kHz ultrasonic vocalizations in rats : Comparison of the effects of different psychoactive drugs and relevance in drug-induced reward. **Neuropharmacology**, Cagliari, v. 63, n. 2, p. 224–234, 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuropharm.2012.03.013>

SIMOLA, Nicola; MORELLI, Micaela. Repeated amphetamine administration and long-term effects on 50-kHz ultrasonic vocalizations : Possible relevance to the motivational and dopamine-stimulating properties of the drug. **European Neuropsychopharmacology**, Cagliari, v. 25, n. 3, p. 343–355, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.euroneuro.2015.01.010>

SMETHELLS, John R. et al. Sex differences in the reduction of impulsive choice (delay discounting) for cocaine in rats with atomoxetine and progesterone. **Psychopharmacology**, Minneapolis, v. 233, n. 15–16, p. 2999–3008, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s00213-016-4345-3>

SWALVE, Natasha et al. Sex-specific attenuation of impulsive action by progesterone in a go/no-go task for cocaine in rats. **Psychopharmacology**, Minneapolis, p. 1–9, 2017.

TARACHA, Ewa et al. Neuropharmacology activity and conditioned place preference effects in rats given repeated amphetamine treatment. 47 **Neuropharmacology journal**, Warsaw, v. 83, p. 128–136, 2014.

THOMPSON, Briar; LEONARD, Kevin C.; BRUDZYNSKI, Stefan M. Amphetamine-induced 50 kHz calls from rat nucleus accumbens: A quantitative mapping study and acoustic analysis. **Behavioural Brain Research**, St. Catharines, v. 168, n. 1, p. 64–73, 2006.

UNODC (United Nations Office on Drugs and Crime), World Drug Report 2019 4, Stimulants, **United Nations publication**, Sales, Vienna. 2017.

UUSI-OUKARI, Mikko; KORPI, E. S. A. R. Regulation of GABA A Receptor Subunit Expression by. **Pharmacological Reviews**, Turku, v. 62, n. 1, p. 97–135, 2010.

VERMA, Vivek. Classic studies on the interaction of cocaine and the dopamine transporter. **Clinical Psychopharmacology and Neuroscience**, Pittsburgh, v. 13, n. 3, p. 227–238, 2015.

VOLKOW, N. D. et al. Dopamine in drug abuse and addiction: Results from imaging studies and treatment implications. **Molecular Psychiatry**, Bethesda, v. 9, n. 6, p. 557–569, 2004.

WENDLER, Etieli et al. Evaluation of 50-kHz ultrasonic vocalizations in animal models of mania : Ketamine and lisdexamfetamine-induced hyperlocomotion in rats. **European Neuropsychopharmacology**, Curitiba, v. 26, n. 12, p. 1900–1908, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.euroneuro.2016.10.012>

WHITE, Tara L.; JUSTICE, Angela J. H.; WIT, Harriet De. Differential subjective effects of D -amphetamine by gender , hormone levels and menstrual cycle phase. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, Chicago, v. 73, p. 729–741, 2002.

WISE, Roy A.; KOOB, George F. The development and maintenance of drug addiction. **Neuropsychopharmacology**, Baltimore, v. 39, n. 2, p. 254–262, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/npp.2013.261>

WÖHR, Markus et al. Critical involvement of 5-HT<sub>2C</sub> receptor function in amphetamine-induced 50-kHz ultrasonic vocalizations in rats. **Psychopharmacology**, Marburg, v. 232, n. 10, p. 1817–1829, 2015.

WÖHR, Markus; SCHWARTING, Rainer K. W. Affective communication in rodents : ultrasonic vocalizations as a tool for research on emotion and motivation. **Cell Tissue Res**, Marburg, v. 354 p. 81–97, 2013.

WRIGHT, Jennifer M.; DOBOSIEWICZ, May R. S.; CLARKE, Paul B. S. The role of dopaminergic transmission through D1-like and D2-like receptors in

amphetamine-induced rat ultrasonic vocalizations. **Psychopharmacology**, Montreal, p. 853–868, 2013. 48

WU, Yinhao Violet; BURNHAM, W. Mc Intyre. Progesterone, 5 $\alpha$ -dihydroprogesterone and allopregnanolone's effects on seizures: A review of animal and clinical studies. **Seizure**, Toronto, v. 63, n. October, p. 26–36, 2018.

YUN, Jaesuk et al. Potential for Dependence on Lisdexamfetamine - In vivo and In vitro Aspects. **Biomolecules & Therapeutics**, Chungju, v. 664, p. 659–664, 2017.



## 8. APÊNDICE – CERTICADO CEUA



Nº 1256

### CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (CEUA/BIO – UFPR), instituída pela Resolução Nº 86/11 do Conselho de Ensino Pesquisa e Extensão (CEPE), de 22 de dezembro de 2011, **CERTIFICA** que os procedimentos utilizando animais no projeto de pesquisa abaixo especificado estão de acordo com a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para fins Científicos e Didáticos (DBCA) estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e com as normas internacionais para a experimentação animal.

### STATEMENT

The Ethics Committee for Animal Use from the Biological Sciences Section of the Federal University of Paraná (CEUA/BIO – UFPR), established by the Resolution Nº 86/11 of the Teaching Research and Extension Council (CEPE) on December 22<sup>nd</sup> 2011, **CERTIFIES** that the procedures using animals in the research project specified below are in agreement with the Brazilian Guidelines for Care and Use of Animals for Scientific and Teaching purposes established by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and with the international guidelines for animal experimentation.

**PROCESSO/PROCESS:** 23075.073299/2018-81

**APROVADO/APPROVAL:** 19/03/2019 – R.O. 02/2019

**TÍTULO:** Influência da progesterona sobre o efeito psicoestimulante da anfetamina em ratos machos e fêmeas.

**TITLE:** Influence of progesterone on amphetamine psychostimulant effects in male and female rats.

**AUTORES/AUTHORS:** Roberto Andreatini, Leticia Trein Medeiros, Camila Pasquini de Souza.

**DEPARTAMENTO/DEPARTMENT:** Farmacologia

Profa. Dra. Katya Naliwaiko  
Coordenadora da CEUA



Documento assinado eletronicamente por **ISELEN ABREU FLORENTINO IVANOSKI, MEDICO VETERINARIO**, em 23/04/2019, às 10:39, conforme art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



A autenticidade do documento pode ser conferida [aqui](#) informando o código verificador **1728803** e o código CRC **5836C1DA**.